JULIANE CRISTINA DE SOUZA SILVA

Efeito da sobrecarga salina no remodelamento vascular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

JULIANE CRISTINA DE SOUZA SILVA

Efeito da sobrecarga salina no remodelamento vascular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Ciências Morfofuncionais

Orientador: Profª Dra. Silvia Lacchini

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Silva, Juliane Cristina de Souza.

Efeito da sobrecarga salina no remodelamento vascular / Juliane Cristina de Souza Silva. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Lacchini.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Fisiopatologia cardiovascular aplicada.

Versão do título para o inglês: Effect of salt overload in vascular remodeling.

1. Sobrecarga salina 2. Remodelamento vascular 3. Matriz extracelular
4. Artérias I. Lacchini, Profa. Dra. Silvia II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0121/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Juliane Cristina de Souza Silva.

Título da Dissertação: Efeito da sobrecarga salina no remodelamento vascular.

Orientador(a): Profa. Dra. Silvia Lacchini.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Aristondo de Sales Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP: 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: icb@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 049 nas fls. 102 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Silvia Lacchini**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Participação do sistema renina-angiotensina no remodelamento vascular após a sobrecarga salina*" do qual participam o(s) alunos **Juliane Cristina de Souza, Kátia Viegas, Thais de Sousa, Nara Rabecchi, Camila de Jesus Piva**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 16.06.2011, com validade de 3 anos.

São Paulo, 21 de junho de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

À minha família por tudo que representam em minha vida!
Em especial, ao meu avô Francisco. Eu queria ter descoberto algo a tempo de te ajudar ou pelo menos diminuir o seu sofrimento, mas sei que agora está feliz e isto é o que me conforta, este trabalho é também dedicado a você, vovô querido!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que me concedeu saúde, capacitação, encorajamento para que eu chegasse até aqui.

Palavras não são e nunca serão suficientes para agradecer aqueles que sempre estiveram ao meu lado. O que sou e aonde cheguei devo a eles. Quando o sonho pela Biologia começou, foram eles os primeiros a incentivarem, e mesmo no decorrer da realização do sonho, diante de tantas dificuldades, lá estavam eles ao meu lado, enxugando os meus lágrimas e me fortificando. Agora, estou prestes a concluir mais uma etapa da minha carreira e como não poderia ser diferente, estão ao meu lado!

À minha **família**, minha profunda gratidão e meu indescritível amor! Vocês são a minha base e meus exemplos de vida! Perdoem-me pelos momentos felizes em família que precisei abrir mão por conta do trabalho, sei que foram momentos especiais que não voltarão jamais e lamento tê-los perdido. Agora, mais crescida e amadurecida, tentarei fazer tudo diferente, pois a vida tem me ensinado que nada no mundo tem mais importância do que a família. Trabalho, estudos, bens...podem esperar, depois é só correr atrás! Mas família, jamais deve esperar! Peço licença para parafrasear uma professora pela qual tenho profunda admiração, Prof^a Dra. Dulce Elena Casarini: “Família deve vir sempre em primeiro lugar na nossa vida, pois quando tudo for mal, não será a ciência que nos apoiará, ao contrário, ela poderá até mesmo se virar contra nós, mas a família, esta nunca nos abandonará!”. Amo muito vocês, obrigada por existirem!

À aquele que tem sido a minha motivação e inspiração todos os dias, **André Bezerra**, obrigada por tornar a minha vida ainda mais bonita! Mesmo longe e com tantos afazeres, sinto sua companhia de perto e como é maravilhoso ter pertinho de mim! Todos os problemas se tornam pequenos, simplesmente por ouvir a sua voz! Sua alegria me faz querer viver! E saber que me ama, me dá forças para continuar! Também não teria chegado aqui se não fosse você comigo. Assim como à minha família (e você já faz parte dela), não há palavras...palavras pouco representam e neste momento chegam a faltar, para expressar tudo que sinto em meu coração por você. Espero

algum dia poder fazê-lo feliz, como me faz feliz. Tudo que tenho feito e sido é por nós dois! Amo muito você!

À Prof^a Dra **Silvia Lacchini**, minha orientadora e amiga. Já completaram 5 anos desde que ingressei na USP sob sua supervisão e me sinto privilegiada por ter como orientadora uma pessoa tão inteligente e ao mesmo tempo, minha amiga. Obrigada por todos estes anos, pelos ensinamentos, pelas conversas, pelas broncas e pelas risadas. Espero poder estar me tornando uma profissional da qual você se orgulha.

Às professoras Dras **Patricia Fiorino** e **Vera Farah**, que mais uma vez me concederam a honra de fazer parte de mais um momento importante de minha vida. Minha eterna gratidão pelo acolhimento, pelo ensino, pela amizade e pelas oportunidades. Meu eterno respeito e admiração pelas profissionais e mulheres que são. Aproveito a oportunidade também para agradecer, e como não agradecer, ao querido professor e coordenador do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde **Adriano Monteiro de Castro**, sempre tão amável e gentil. Obrigada professor por mais uma vez ter aberto as portas para mim e me conceder a oportunidade de desenvolver meu trabalho nesta universidade que tanto amo.

Ao **Laboratório de Morfologia Funcional Aplicada a Cardiologia**: Katia Viegas, Thais, André, Junior, Tati1..2..3.., Nara, Camila, Bárbara, Leticia, Rodrigo, Adriano, Jô, Thulio, Rafaela, Marcela, Luryê, Ricardo, Fábio e todos aqueles que passaram pelo laboratório e fizeram de alguma maneira parte desta etapa. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela companhia, pelas conversas, pelas risadas e até mesmo pelas lágrimas.

Ao **Laboratório de Fisiofarmacologia Metabólica, Cardiovascular e Renal**, não me atrevera escrever o nome de cada um dos alunos, pois por serem muitos, eu poderia cometer a injustiça de esquecer-me de alguém. Mas quero que se saibam que foram lembrados em meus agradecimentos, pois a maneira como fui bem recebida e a maneira carinhosa como me ajudaram, eu jamais irei esquecer. Meu “muito obrigada” a todos os alunos do laboratório, em especial a Bruna: Bru, você é dez!

Como eu jamais poderia deixar de destacar, minha gratidão é também a vocês alunos do **Laboratório de Histologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie**: Rachel, Eli, Lutz, Vivi, Nath e Lilian e todos aqueles que passaram por este laboratório.

Não é simplesmente um laboratório, mas uma família. Obrigada por resgatarem em mim o desejo de ensinar, obrigada porque não foram ensinamentos transmitidos, mas conhecimentos trocados, obrigada pela amizade formada. Podem ter certeza de que cada um conquistou um lugarzinho especial em meu coração, temos idades semelhantes, mas sinto uma necessidade de ajuda-los e protege-los, como se fossem meus filhos. Marcaram a minha história positivamente, espero poder ter marcado assim a de vocês também.

À prof^a **Maria Claudia Irigoyen e ao Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor/HC.FMUSP**, em especial ao Fernando, Michelle e ao Dudu, pela disponibilidade em me ajudar e permitir que eu fizesse uso dos equipamentos necessários para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Como não agradecer a **Cintia Taniguti, Iara Sasso, Marcele Sayuri, Cris e Laris**? Amigas que tenho guardado em meu coração, obrigada por tornarem os dias de trabalho tão mais agradáveis, obrigada pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa, mas acima de tudo obrigada pela amizade verdadeira. Amo vocês!

À **Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas, ao Departamento de Anatomia, ao Programa de Pós-Graduação e todos os coordenadores e diretores dos mesmos**. Obrigada pela oportunidade que me foi concedida de realizar não somente minha iniciação científica como o desenvolvimento de meu mestrado.

Aos técnicos responsáveis pelas diferentes áreas do ICB, nas quais a ajuda foi fundamental. Em especial, aos técnicos do **Biotério do Depto de Anatomia/ USP**: Rodrigo, Fábio e Renivaldo que tão bem cuidaram de meus animais durante o experimento. Aos técnicos do **laboratório multiusuário**: Martinha, Soninha, Kelly e Boleta pelo auxílio na preparação das lâminas. Aos técnicos do **bloco didático do ICB III** pelo auxílio no cuidado e preparação das peças anatômicas durante todo o período em que fui monitora PAE para a turma da medicina. E a todos os demais técnicos que porventura eu não tenha citado, por esquecimento, minha profunda gratidão por terem me auxiliado no cumprimento de mais uma etapa importante da minha vida profissional.

À Mônica, responsável pela Biblioteca do ICB e à Patricia, secretária responsável pela pós-graduação, por toda paciência e disponibilidade em me ajudar a concluir minha dissertação.

A **CAPES**, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento de todo o estudo.

E por fim, mas nunca menos importante, aos professores que compuseram as minhas bancas de ingresso no mestrado, qualificação e agora, defesa. Assim como aos professores na qual tive o privilégio de assistir as aulas e trabalhar junto, em especial ao prof **Richard Cabral** e prof **Bruno Rodrigues**, obrigada por tudo!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

SILVA, J. C. S. **Efeito da sobrecarga salina no remodelamento vascular**. 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Neste estudo, os objetivos propostos foram: 1) verificar o efeito da sobrecarga salina 1% sobre a pressão arterial e variáveis relacionadas ao controle hídrico em camundongos machos e fêmeas; 2) comparar os efeitos da sobrecarga salina sobre o remodelamento vascular de artérias elásticas e de resistência em machos e fêmeas. Para tal, foram usados camundongos C57Bl/6 machos e fêmeas tratados por 2 ou 12 semanas com solução de NaCl 1% para beber ou água fresca (grupo controle). Foram realizadas análises morfometria corporal, controle hidroeletrólítico, controle hemodinâmico e remodelamento vascular. Observamos como resultados principais: 1) ao aumento de peso corporal em machos; 2) ao aumento da massa cardíaca especialmente em fêmeas e ao aumento da massa renal tanto em machos como em fêmeas; 3) ao aumento da ingestão de água e de excreção de urina, concomitante ao aumento da concentração de eletrólitos urinários e manutenção dos eletrólitos séricos; 4) ao aumento da proteinúria, sem alteração importante do clearance de creatinina; 5) a modificações na estrutura da parede arterial, especialmente na matriz colágena, mesmo que sem modificação da pressão arterial.

Palavras-chave: Sobrecarga salina. Remodelamento vascular. Matriz extracelular. Artérias.

ABSTRACT

SILVA, J. C. S. **Effect of salt overload in vascular remodeling**. 2013. 89 p. Masters thesis (Science Morphofunctional) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

In this study, the objectives were: 1) determine the effect of 1% salt overload on blood pressure and related variables controlling water in male and female mice, 2) to compare the effects of salt overload on vascular remodeling of elastic arteries and strength in both males and females. To this end, we used C57BL / 6 males and females treated for 2 or 12 weeks with 1% NaCl solution for drinking or fresh water (control group). Analyses morphometry body control fluid and electrolyte control hemodynamic and vascular remodeling. We observed results as: 1) increased body weight in male and 2) the increase in cardiac mass especially in females and increase renal mass in both males and females, and 3) the increase in water intake and excretion of urine, concomitant with increased concentration of urinary electrolytes and maintenance of serum electrolytes; 4) the increase in proteinuria, with no significant changes in creatinine clearance, 5) changes in the structure of the arterial wall, especially in the collagen matrix, even without modification blood pressure.

Keywords: Salt overload. Vascular remodeling. Extracellular matrix. Arteries.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Protocolo Experimental.....	31
Figura 2 -	Plestimografia de cauda.....	33
Figura 3 -	Sistema de obtenção e análises de medidas hemodinâmicas (BP-2000 Blood Pressure Analyses).....	34
Figura 4 -	Esquema didático de visualização de artéria corada por Weigert Van-gienson.....	38
Figura 5 -	Análise de coloração picrosirius – campo claro.....	39
Figura 6 -	Medida de peso corporal semanal.....	43
Figura 7 -	Comprimento Naso-anal.....	44
Figura 8 -	Relação do peso do coração pelo peso corporal.....	45
Figura 9 -	Relação entre o peso do coração pelo comprimento naso-anal.....	46
Figura 10 -	Relação do peso do rim pelo peso corporal.....	47
Figura 11 -	Relação entre o peso do rim pelo comprimento naso-anal.....	48
Figura 12 -	Volume de água ingerida.....	49
Figura 13 -	Volume de urina excretada.....	50
Figura 14 -	Quantidade de sódio urinário.....	52
Figura 15 -	Quantidade de cloreto urinário.....	53
Figura 16 -	Quantidade de potássio urinário.....	53
Figura 17 -	Proteínas totais urinárias.....	54
Figura 18 -	Creatinina urinária.....	55
Figura 19 -	Uréia.....	55
Figura 20 -	Hematócrito.....	56
Figura 21 -	Dosagem de sódio no soro.....	57
Figura 22 -	Dosagem de cloreto no soro.....	58
Figura 23 -	Dosagem de creatinina no soro.....	58
Figura 24 -	Clearance de creatinina.....	59
Figura 25 -	Medidas de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca.....	60
Figura 26 -	Lamelas elásticas da aorta.....	61

Figura 27 -	Lamelas elásticas em artérias cardíacas	62
Figura 28 -	Relação entre colágeno perivascular e diâmetro em artérias cardíacas	63
Figura 29 -	Relação entre colágeno perivascular e diâmetro em aorta.....	64
Figura 30 -	Análise das diferentes espessuras de fibras de colágeno em artérias cardíacas.....	65
Figura 31 -	Análise das diferentes espessuras de fibras de colágeno em aorta.....	65
Figura 32 -	Fotomicrografias representativas de artérias cardíacas de camundongos coradas por picrossirius..	66
Figura 33 -	Fotomicrografias representativas de artérias cardíacas de camundongos coradas por picrossirius..	67
Figura 34 -	Fotomicrografias representativas de aortas de camundongos coradas por picrossirius.....	68
Figura 35 -	Resumo dos resultados encontrados.....	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Sobrecarga Salina.....	17
1.2	Hipertensão e Complicações Cardiovasculares.....	19
1.3	Vasos e Remodelamento de Matrix Extracelular (MEC).....	20
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	24
3	OBJETIVOS.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1	Animais.....	29
4.2	Tratamentos.....	29
4.3	Protocolo experimental.....	30
4.4	Pesagem e avaliação do volume ingerido e urina.....	31
4.5	Avaliação da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca.....	32
4.6	Coleta de tecidos.....	34
4.7	Análise em urina e soro.....	35
4.8	Processamento histológico e morfometria.....	36
4.9	Avaliação da deposição de fibras colágenas e lamelas elásticas vasculares.....	36
4.9.1	<i>Análise das lamelas elásticas.....</i>	37
4.9.2	<i>Análise das fibras colágenas.....</i>	38
4.10	Análise estatística.....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Medidas morfométricas corporais.....	43
5.1.1	<i>Medidas corporais.....</i>	43
5.1.2	<i>Avaliação do peso do coração.....</i>	45
5.1.3	<i>Avaliação do peso renal.....</i>	47
5.2	Avaliação metabólica.....	49
5.2.1	<i>Consumo hídrico e excreção urinária.....</i>	49
5.2.2	<i>Dosagem urinária de sódio, potássio, cloreto, proteínas totais e creatinina e uréia.....</i>	51
5.2.3	<i>Hematócrito e avaliação sérica de sódio, cloreto e creatinina.....</i>	55
5.3	Avaliação hemodinâmica.....	59
5.4	Avaliação do remodelamento de MEC vascular.....	60
5.4.1	<i>Avaliação das lamelas elásticas.....</i>	60

5.4.2	<i>Avaliação das fibras de colágeno.....</i>	62
6	DISCUSSÃO.....	70
7	CONCLUSÕES.....	77
7.1	Perspectivas Futuras.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80
	ANEXOS.....	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sobrecarga Salina

Por muitos anos da história da civilização humana, o consumo de sal era pobre, representando a quantidade existente apenas em alimentos naturais, ou seja, menos do que 0,5 g de sal (0,2 g de sódio) por dia. Apenas cerca de 5000 anos atrás, os chineses descobriram no sal o poder conservante de alimentos, passando este a ter grande importância econômica. Mesmo após a invenção da refrigeração, o sal manteve sua importância, pois o homem percebeu que aqueles alimentos que continham sal, possuíam melhor sabor quando comparados aos alimentos sem sal (FENG; MACGREGOR et al., 2011).

A tecnologia avançou e permitiu a produção de alimentos processados, facilitando a vida daqueles que tinham e têm de trabalhar por muitas horas diárias. Contudo, a ingesta de sal aumentou exponencialmente, passando o consumo de muitos países a ser de 9 a 12 g/dia, enquanto o recomendado pela Organização Mundial da Saúde é de 5 g/dia. (OMS, 2013).

Este grande aumento do consumo de sal é relativamente recente em termos evolutivos, tornando-se um grande desafio para os sistemas fisiológicos para excretar essas grandes quantidades de sal através dos rins. Os primeiros comentários a respeito dos efeitos do sal sobre a função circulatória e renal foram encontrados em antigos manuscritos chineses (HE et al., 2012; STRAZZULLO et al., 2009).

Nos países ocidentais as relações entre sal e pressão arterial (PA) somente foram reconhecidas a partir do século XX, por meio de estudos de grandes pesquisadores. Coleman e Guyton, em 1969, propuseram uma teoria baseada na sequência de eventos verificados quando se produz uma carga de sódio em cães parcialmente nefroctomizados; durante a sobrecarga de sódio, num primeiro momento, haveria um aumento de pressão associado a um aumento de débito cardíaco, isso provocaria uma alta perfusão tecidual seguida de uma vasoconstrição periférica com função autorreguladora protetora para reduzir o fluxo periférico até os valores normais (COLEMAN; GUYTON, 1969).

Cowley demonstrou que variações na ingesta de sal são provavelmente as alterações diárias mais comuns da osmolalidade e relacionou-a a sede, como maneira

de excretar o sódio (COWLEY et al., 1983; COWLEY et al., 1986). Outro estudo clássico foi com respeito aos hipertensos sal-sensíveis, onde Krieger e Coleman demonstraram que estes indivíduos possuem aumento de PA estritamente correlacionado com a retenção de água e sódio, expansão de volume e aumento de débito cardíaco (KRIEGER; COWLEY, 1990).

Estes estudos propuseram que o balanço de sódio após a ingestão de sal é regulada por natriurese no rim. O sódio é transportado no plasma, gerando um temporário aumento do volume plasmático, que logo em seguida volta aos níveis normais devido ao mecanismo natriurético renal (GUYTON et al, 1970).

Contudo, algumas pessoas possuem deficiências nesta capacidade de excreção, e a retenção de sódio provoca expansão, não mais temporária, do volume extracelular causando maior débito cardíaco com maior perfusão do tecido. Este fato excede as necessidades metabólicas, resultando em respostas fisiológicas autorreguladoras como vasoconstrição, e aumento da resistência periférica, com consequente aumento de pressão arterial (PA) (MENETON et al., 2005; WEINBERGER, 1996).

Muitos estudos foram realizados demonstrando a relação direta da ingestão de sal e a elevação da PA, os resultados encontrados mostraram que a alta ingestão de sal é prejudicial à saúde e apresenta consequências distintas, devido à heterogeneidade populacional e ao desenho experimental. O principal estudo realizado foi o INTERSALT, que incluiu 10.079 indivíduos de 52 cidades ao redor do mundo, demonstrando significativa relação entre a ingestão de sal e o aumento da PA com a idade. Estimou-se que o aumento de 6 g / dia na ingestão de sal em 30 anos conduz a um aumento na pressão arterial sistólica (PAS) em 9 mmHg. (Intersalt Cooperative Research Group, 1988).

Em contrapartida, estudos demonstram que a redução da ingestão de sal na dieta poderia levar a uma diminuição dos níveis de PAS, independentemente se o indivíduo é hipertenso ou normotenso. Efeitos combinados sobre a PA de uma baixa ingestão de sódio e a dieta DASH foram iguais ou maiores do que os efeitos da intervenção de um único medicamento (SAKS et al., 2001).

1.2 Hipertensão e Complicações Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DC) são a principal causa de morbimortalidade no mundo em geral. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2008, cerca de 17,3 milhões de pessoas morreram por DC, compondo dois terços de todas as mortes no mundo. Em média ocorrem 9,4 milhões de mortes por ano, 16,5% de todas as mortes pode ser atribuída à hipertensão arterial, isso inclui 51% das mortes por acidente vascular cerebral e 45% das mortes por doença coronariana (OMS, 2013).

Diversos estudos evidenciam a ação cardioprotetora dos hormônios femininos. De fato, com a diminuição da produção do hormônio estrogênio no climatério, o índice de mortalidade feminino por DC aumenta (MILLER et al., 2013). Em geral, no Brasil, os homens são mais acometidos por estas doenças em relação às mulheres, a prevalência é de 35,8% nos homens e de 30% em mulheres, semelhantemente a de outros países onde pesquisas realizadas de 2003 a 2008, mostrou a prevalência global de 37,8% em homens e 32,1% em mulheres (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010), mas esta diferença se equipara e até mesmo se inverte, em alguns casos, quando comparados homens e mulheres com idade igual ou superior aos 50 anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

De acordo com o Ministério da Saúde, em 2010, no Brasil cerca de 30% das mulheres vieram a falecer por AVC ou infarto agudo do miocárdio (OMS, 2013). Acredita-se que estes índices se devem ao fato de nesta fase, as mulheres perderem a proteção cardiovascular, pela diminuição da produção do hormônio estrogênio, que confere propriedades antioxidantes (DEBING et al., 2007). Além disso, está bem descrito o aumento da PA não só com o incremento da idade, mas também em relação ao sexo, encontrando-se predominantemente menor em mulheres pré-menopausa (MILLER et al., 2013).

Mesmo em modelos experimentais observa-se uma PA reduzida em ratas ooforectomizadas (IRIGOYEN et al., 2005; RECKELHOLF et al., 2000; STAESSEN et al., 1997; WEIS, 1972).

A hipertensão arterial essencial ou primária (HAS) é, sem dúvida, uma das doenças cardiovasculares mais comuns, podendo afetar aproximadamente 20% da população adulta em sociedades industrializadas (SANJULIANI et al., 2002). Trata-se de uma doença de causa multifatorial para a sua gênese e desenvolvimento, sendo resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais, como por exemplo, estresse, sedentarismo, obesidade, dieta hipersódica, etc. Neste contexto a HAS é definida por uma PAS maior ou igual a 140 mmHg e pressão arterial diastólica (PAD) a 90 mmHg. A HAS pode levar ao desenvolvimento de doenças coronarianas, acelerando o processo aterosclerótico, além de ser determinante para o surgimento de morbidades e mortalidades cardiovascular, como por exemplo: insuficiência cardíaca, AVC e insuficiência renal (IRIGOYEN et al., 2010).

1.3 Vasos e Remodelamento de Matriz Extracelular (MEC)

O aporte adequado de nutrientes do sangue para os tecidos ocorre graças a um sistema de bomba e dutos que tem a capacidade de se moldar diante de cada situação. O sangue é bombeado a partir do coração para grandes artérias de condutância (elásticas), destas para artérias de resistência (musculares), até chegar aos capilares, que permitem as trocas gasosas e nutritivas com as células. Este é um processo contínuo, ou seja, o volume de sangue armazenado durante o esvaziamento (sístole) das câmaras cardíacas é enviado à periferia corpórea no período em que o ventrículo estiver no processo de enchimento (diástole), garantindo assim um fluxo permanente aos capilares (IRIGOYEN et al., 2010).

Tanto as artérias elásticas como as musculares são compostas por três camadas ou túnicas: túnica íntima, túnica média e túnica adventícia. A túnica íntima apresenta uma camada de epitélio pavimentoso em sua superfície interna, denominada endotélio, associada a um tecido conjuntivo frouxo em maior ou menor quantidade, segundo o calibre do vaso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O endotélio, além de ter um papel importante na troca de moléculas e células entre o sangue e os tecidos, também tem a função de produzir fatores vasoativos, como as endotelinas, que são substâncias

vasoconstritoras, e o óxido nítrico, que é um importante vasodilatador da musculatura vascular (VIEGAS; LACCHINI, 2008).

Já a túnica média é constituída principalmente por células musculares lisas e matriz extracelular (MEC), essencial na regulação da homeostase e arquitetura tecidual (STAMENKOVIC et al., 2003). A túnica média é a responsável pela síntese da MEC. Esta túnica é importante para a regulação do fluxo sanguíneo, sendo capaz de se distender (até um limite determinado pelo conteúdo colagênico) e de retornar elasticamente ao seu estado anterior (devido à presença das lamelas elásticas), garantindo a manutenção do fluxo de sangue no sistema (VIEGAS; LACCHINI, 2008).

Por último, a túnica adventícia se caracteriza pela presença de tecido conjuntivo, tendo como principal componente os fibroblastos e MEC por eles sintetizado, especialmente colágeno do tipo I e fibras elásticas. Além disso, em artérias de grande calibre, são encontrados vasos nutritivos (*vasa vasorum*), tecido adiposo, terminações nervosas, nervos e eventuais células inflamatórias (JUNQUEIRA et al., 2005). Desta maneira, o vaso é capaz de modificar sua estrutura e função de acordo com as necessidades fisiológicas (TULIS et al., 1998), desencadeando um processo complexo e dinâmico denominado remodelamento vascular (LÜSHER et al., 1995).

Os processos que envolvem o remodelamento vascular estão relacionados a situações de reparo, inflamação, desenvolvimento ou crescimento (STAMENKOVIC et al., 2003). A MEC é constituída por numerosas proteínas, sendo as colágenas seu principal componente, além de diversas outras proteínas como proteoglicanas, glicosaminoglicanas, elastina, laminina e metaloproteases de matriz (VIEGAS; LACCHINI, 2008). Em conjunto, estas constituem um arcabouço que auxilia na manutenção da integridade do tecido, regula a migração de células e funciona como um reservatório de citocinas e fatores de crescimento (STAMENKOVIC et al., 2003).

As macromoléculas que constituem a MEC são produzidas localmente pelas células adjacentes, e estas por sua vez auxiliam na sua organização e nas propriedades físicas dos tecidos. Além disso, desempenham um papel complexo ativo na regulação do comportamento das células (ALBERTS et al., 2010).

Em condições normais, a perfusão tecidual é garantida pela capacidade dos vasos sanguíneos, especialmente as artérias, de adaptar o seu diâmetro, estrutura da

parede vascular e a composição desta em resposta a estímulos. Tais estímulos levam ao remodelamento de forma a manter a estabilidade entre fluxo e tensão de parede. A MEC dos vasos sanguíneos contribui significativamente para as propriedades físicas e biológicas que controlam o fluxo de sangue aos tecidos (FITZSIMMONS; SHANAHAN, 2002).

A parede de vasos, como já mencionado anteriormente, consiste em três camadas: íntima, média e adventícia; cada qual contendo um tipo celular específico que produz MEC vascular e a integridade desta nas três camadas é essencial para a manutenção das propriedades físicas da vasculatura tais como estiramento, contração e compressão (FITZSIMMONS; SHANAHAN, 2002).

As propriedades elásticas das artérias dependem em grande parte dos componentes da MEC, especialmente elastina e o colágeno, e da organização espacial destes com as células musculares lisas. Alterações nestes e em outros componentes da parede vascular estão associadas ao remodelamento arterial (GLAGOV et al., 2002).

O colágeno é o componente mais abundante da MEC e atua na manutenção da sua integridade e resistência à tensão da parede vascular (PLENZ et al., 2003), formando uma rede de sustentação tanto em vasos sanguíneos de humanos como de outros vertebrados (VIEGAS; LACCHINI, 2001; STHEBENS, 1996).

O genoma humano contém 42 genes distintos que codificam diferentes cadeias alfa de colágeno (ALBERTS et al., 2010) e diferentes combinações destes geram cerca de 28 tipos diferentes de colágeno (GORDON; HAHN, 2010). Destes, treze tipos são encontrados em vãos sanguíneos ou expressos por suas células (PLENZ et al., 2003), sendo o tipo I, III e IV predominantes (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; ELLIOTT et al., 2005; LODISH et al., 2004).

A organização especial das fibrilas de colágeno reflete interações entre estas e outros componentes da matriz, como os proteoglicanos, por exemplo, que formam um gel hidratado, no qual estão embebidas as fibras protéicas da MEC, que interagem com o colágeno contribuindo para o turgor da MEC (ALBERTS et al., 2010).

Além do colágeno, outros elementos das MEC interagem com as células adjacentes, como por exemplo, laminina, elastina, fibronectina, tenascina e outras proteínas de adesão e, todos estes, atuam no processo de remodelamento.

O componente elástico da MEC também é muito importante na composição estrutural dos vasos sanguíneos. Na estrutura de grandes artérias como a aorta, a elastina é o componente principal que responde pela elasticidade e distensão, propriedade fundamental na função cardiovascular, permitindo o fluxo sanguíneo adequado para a irrigação dos órgãos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SONG; ROACH, 1985).

No entanto, em artérias de resistência, a leptina é o componente menos abundante, embora muito importante no estabelecimento de suas propriedades elásticas, no remodelamento e na progressão da hipertensão, aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (BRIONES et al., 2003; FAURY et al., 2003; GONZALEZ et al., 2005).

O remodelamento constante da MEC envolve quebras de seus componentes por proteases, principalmente a família das metaloproteases (MMPs) (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; MOTT; WERB, 2004).

Até o momento, 28 tipos de MMPs já foram identificadas (GUPTA; PATIL, 2012), sendo importantes na clivagem de componentes da matriz, como elastina, fibronectina colágenos e laminina (LODISH, 2004; McCAWLEY; MATRISIAN, 2001).

Em suma, o remodelamento da MEC vascular passa por três etapas: (1) detecção de mudanças hemodinâmicas e fatores humorais desencadeando (2) sinalização autócrina e parácrina com síntese, liberação e ativação de substâncias que influenciam o crescimento, morte ou migração celular, ou a composição da MEC resultando em (3) mudanças estruturais na parede vascular (GIMBRONE, 1999). Em outras palavras, o remodelamento vascular é uma resposta fisiológica adaptativa dos vasos, mas que a longo prazo pode contribuir para o desenvolvimento de doenças vasculares.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Levando em consideração que as doenças cardiovasculares constituem a principal causa de morbimortalidade e que os índices de hipertensão arterial tem se elevado a cada ano em diversos países, podemos propor o seguinte questionamento: se grande parte da população mundial tem alto consumo de sódio em sua dieta, este promoveria algum malefício à saúde vascular independente de fatores hemodinâmicos?

Dessa maneira, nossa hipótese é de que a quantidade de sódio provinda da dieta poderia influenciar a capacidade do sistema cardiovascular em responder e adaptar-se a diversas situações, independentemente da pressão arterial, e que a resposta diante desta influência pode se dar de forma diversa em função a tempo de exposição e sexo.

3 OBJETIVOS

Para responder a hipótese apresentada, o objetivo do presente trabalho é verificar o efeito da sobrecarga salina em 1% na pressão arterial e frequência cardíaca, assim como em possíveis respostas vasculares locais e se tais respostas seriam ou não diferentes em machos e fêmeas.

Este objetivo pode ser subdividido em dois pontos específicos:

- verificar o efeito da sobrecarga salina 1% sobre a pressão arterial e variáveis relacionadas ao controle hídrico em camundongos machos e fêmeas;
- comparar os efeitos da sobrecarga salina sobre o remodelamento vascular de artérias elásticas e de resistência em machos e fêmeas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para responder aos objetivos propostos, foram utilizados camundongos isogênicos machos e fêmeas C57Bl/6, provenientes do Biotério do Departamento de Anatomia – ICB/USP, mantidos em salas com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura controlada e livre acesso à água e ração. Os estudos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP (protocolo no 049 nas fls. 102 do livro 02).

Foram utilizados 59 animais recém-desmamados, divididos em cerca de 29 machos e 30 fêmeas. Tanto machos quanto fêmeas foram divididos em 3 grupos (1 controle e 2 experimentais), cada um com aproximadamente 10 animais.

4.2 Tratamentos

Os animais foram tratados ou não com solução de NaCl 1% (salina) para beber, sendo os tempos de tratamento de 2 ou 12 semanas. Ressaltamos que todos os grupos foram incluídos no estudo a partir de 4 semanas de idade. O grupo controle permaneceu em observação por 12 semanas até atingir a idade final de 16 semanas. Por outro lado, o grupo sal 2 semanas recebeu solução salina nas 2 últimas semanas, já com 14 semanas de idade. O grupo sal 12 semanas iniciou o tratamento com 4 semanas até atingir a idade final de 16 semanas. Este cuidado com a idade dos animais se deu para que todos os animais, independentemente de tratados ou não, possuissem a mesma idade ao final do tratamento, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1- Esquema do tratamento in vivo dos animais, com relação à idade inicial, tempo de tratamento e idade final dos animais ao final do experimento.

Grupos (machos/fêmeas)	Idade Inicial	Tempo de tratamento	Idade Final
CONTROLE	4 semanas	0 semanas	16 semanas
SAL 2 SEMANAS	4 semanas	2 semanas	16 semanas
SAL 12 SEMANAS	4 semanas	12 semanas	16 semanas

4.3 Protocolo experimental

Como comentado anteriormente, todos os animais iniciaram no protocolo experimental com 4 semanas e terminaram com 16 semanas de idade (Figura 1). Ao longo dos tratamentos, os animais foram pesados semanalmente. Ao final das 16 semanas de protocolo, os animais foram submetidos à gaiola metabólica, para avaliação precisa do volume ingerido de água e excreção de urina, além de análises metabólicas. Ao término do período de protocolo, os animais foram eutanasiados e perfundidos para a avaliação morfométrica.

Figura 1 - Protocolo Experimental

Esquema demonstrando o tratamento dos animais ao longo do tempo. São apresentados na primeira linha (de cima para baixo) o grupo controle, na segunda, o grupo tratado por duas semanas e na terceira linha o grupo tratado por 12 semanas. Todos os tratamentos foram realizados em machos e fêmeas.

4.4 Pesagem e Avaliação do volume ingerido e urina

Ao longo dos tratamentos, os animais foram pesados semanalmente. Ao final dos protocolos experimentais, os animais foram colocados individualmente em gaiola metabólica, para avaliação precisa do volume ingerido de água e excreção de urina. Este procedimento foi realizado inicialmente sob supervisão da Profa. Dra. Maria Claudia Irigoyen, do Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor/HC FMUSP.

Para se obter o volume exato da água ingerida pelo animal, foi colocado no bebedouro um volume conhecido e, após 24 horas, o volume remanescente no bebedouro foi novamente medido, considerando-se também o volume de água desprezada encontrada em um coletor. Daí, calcula-se a diferença entre o valor inicial e o final de água, para se obter o valor preciso que foi ingerido.

Para se obter o valor preciso de urina, foi colocado nos coletores de urina das gaiolas metabólicas óleo mineral em quantidade suficiente a cobrir a superfície da urina que posteriormente foi excretada (uma vez que a urina por ser mais densa, tende-se a depositar ao fundo do recipiente), garantindo então, que a urina ali contida não evaporasse. Após 24 horas, a urina foi coletada e centrifugada para que o óleo, a urina e qualquer outro material biológico ou não, realmente se separassem. Com auxílio de pipeta, a urina foi retirada do recipiente e novamente centrifugada, a fim de se certificar de que não houve contaminação. Os tubos de urina, devidamente identificados, foram então colocados em freezer -20°C até dar-se início a análise.

Além disso, ao final do estudo foi feita a medida Naso-Anal, a qual consiste na colocação do animal, já anestesiado, sobre uma régua e consequente medida da distância entre as regiões nasal e anal, com objetivo de avaliar se o tratamento interferiu no crescimento dos animais. Esta e outras medidas (descritas a seguir) foram realizadas sob a supervisão das Profas. Dras. Vera Farah e Patricia Fiorino, no Laboratório de Fisiofarmacologia Metabólica, Cardiovascular e Renal, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

4.5 Avaliação da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca

Na última semana de tratamento, antes da avaliação em gaiola metabólica, foi feita medida de PAS por pletismografia de cauda. É importante ressaltar que durante a semana prévia à medida, os animais foram adaptados ao sistema. A realização da adaptação foi feita colocando-se os animais nos tubos de contenção por um breve período, sendo posicionado o manguito para as medidas em torno da cauda. Este procedimento foi repetido durante 3 dias seguidos para que os animais se habituassem com o equipamento e a rotina, permitindo a obtenção de medidas mais fidedignas e sem a interferência de variáveis como o estresse de uma mudança de rotina. As variáveis hemodinâmicas foram avaliadas para se ter controle de que os tratamentos não modificam a pressão arterial, importante fator que atua na estrutura do sistema cardiovascular, e assim garantir que os resultados obtidos fossem independentes de

fatores hemodinâmicos. O método de medida usado nos permite obter apenas a pressão arterial pulsátil (PA) e a frequência cardíaca (FC).

As medidas da PAI foram obtidas através do método de esfignomanômetro de cauda, onde o camundongo é colocado numa caixa restritora (Figura 2), e aquecida para promover uma vasodilatação na cauda do mesmo. O esfignomanômetro adaptado para camundongos é colocado na cauda do animal e insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo para a artéria caudal, sendo a obstrução do fluxo diminuída lentamente, até a captação dos primeiros picos de pressão arterial sistólica.

Figura 2 - Plestimografia de Cauda

Esquema simplificado do sistema de medida de pressão caudal utilizado nos experimentos.

Os picos de pressão arterial sistólica ou pulsátil são captados pelo Sistema BP-2000 series II, que consiste de um transdutor eletromagnético localizado na cauda do animal e conectado a um amplificador, que repassa o sinal para um conversor analógico-digital, registrando, assim, os valores em tempo real no microcomputador. Os valores obtidos foram analisados pelo programa BP-2000 Blood Pressure Analysis (Figura 3).

Figura 3 - Sistema de obtenção e análises de medidas hemodinâmicas (BP-2000 Blood Pressure Analysis).

Representação do programa de análise de dados de pressão e frequência cardíacas.

Para a determinação da PA e FC de repouso foram consideradas as médias aritméticas de dez registros bons realizados em um mesmo dia, para cada animal (BRUM et al., 2002; HEIN et al., 1999; MEDEIROS et al., 2000). Estes procedimentos foram realizados sob supervisão das Profas. Dras. Vera Farah e Patricia Fiorino.

4.6 Coleta dos tecidos

Conforme informado anteriormente, os grupos tratados foram eutanasiados a fim de obter-se tecidos para análise histológica. O peso corporal dos animais foi medido antes de se dar início a eutanásia e, ao final da mesma, os pesos dos órgãos foram obtidos a fim de se obter a medida de peso relativo dos órgãos em relação ao peso corporal e identificar desta maneira se os tratamentos realizados levaram a uma possível hipertrofia. Portanto, para avaliação morfométrica, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico, com injeção intraperitoneal de ketamina (180 mg/kg) e xylazina (20 mg/kg).

Os animais foram dispostos em decúbito dorsal, sendo feita toracotomia mediana e exposição do coração. Em seguida, foi realizada a perfusão, que consiste na lavagem do sistema vascular com solução fisiológica acrescida de KCl, sob pressão constante de 80 a 90 mmHg, através do ápice do coração, no ventrículo esquerdo, e pequeno corte do átrio direito, para extravasamento de sangue e soro. Posteriormente, o animal foi perfundido com formol a 4% tamponado (tampão fosfato de sódio). Terminado o processo de perfusão, foram coletados coração e aorta, além de sangue para obtenção de soro.

Após a realização da eutanásia e coleta dos tecidos, os animais foram descartados em saco identificado para resíduos biológicos e congelados em freezer -20°C apropriado para descarte de animais, localizado no biotério do Depto de Anatomia. Este material é semanalmente coletado e processado como resíduo biológico.

4.7 Análises em urina e soro

Durante o protocolo experimental, os animais foram dispostos individualmente em gaiolas metabólicas, permitindo não apenas a quantificação de volume de água ingerido, mas a coleta de urina.

Para a quantificação de hematócrito, foi coletado sangue em um tubo capilar a partir do tórax anteriormente aberto. Após centrifugação, foi feita a leitura em tabela apropriada da porcentagem de volume de hemácias para o volume sanguíneo coletado. Esta medida dá uma ideia se o animal tem o seu volume sanguíneo expandido, se está retendo líquidos, complementando os resultados obtidos nas análises de pressão arterial e bioquímicas.

A urina coletada foi submetida à análise bioquímica para identificação de proteínas totais, creatinina, uréia, sódio e cloreto. No soro foi realizada a medida de creatinina, sódio e cloreto. As demais análises não foram realizadas devido a grande quantidade de soro que os kits específicos exigem (nem mesmo repetindo o experimento foi conseguido quantidade suficiente por animal para a realização de tais métodos. Além disso, os níveis de potássio foram analisados somente em urina, pois no

soro o resultado não seria fidedigno devido a hemólise encontrada). Estas avaliações permitiram acompanhar, se houve um controle adequado da excreção de sódio pelos grupos que receberam sobrecarga salina, além de fornecer indícios sobre a função renal, permitindo entender se os rins dos animais submetidos à sobrecarga salina estavam funcionando adequadamente ou se apresentavam algum indício de alteração de função, compatível com uma possível hipertensão. A análise bioquímica para identificação de creatinina, proteínas totais e uréia foi realizada em Espectrofotômetro do tipo fotômetro de filtro da marca Humalyzer, modelo 3000 e, fizemos uso da técnica enzimática colorimétrica com os kits da marca LabTest.. Já para quantificação de sódio, cloreto e potássio foram utilizados Analisador de eletrólitos modelo AVL 9180, marca Roche, tendo como fundamento de técnica eletrodo íon seletivo. Todas estas técnicas descritas foram realizadas sob a supervisão das Professoras Dras. Vera Farah e Patricia Fiorino.

4.8 Processamento histológico e morfometria

Para realização da análise histológica, os tecidos após perfusão e coleta foram mantidos por 24 horas em formol tamponado a 4%. Após este período, os tecidos foram mantidos imersos em álcool 70%, e posteriormente foram dispostos em cassete plástico devidamente identificado e processados em aparelho auto-técnico com ciclo total de 8 horas (realizando a desidratação, diafanização e parafinização do material). Os tecidos processados foram incluídos em paraplast usando uma central de inclusão, levados a micrótomo e cortados em 5µm de espessura. Estas técnicas foram realizadas sob a supervisão das Professoras Dras. Vera Farah e Patricia Fiorino. A análise dos cortes foi realizada em microscópio acoplado a sistema de análise de imagens.

4.9 Avaliação da deposição de fibras colágenas e lamelas elásticas vasculares

As alterações na estrutura ou composição da MEC, especialmente dos sistemas elástico e colágenos, responsáveis (respectivamente) pelas propriedades de complacências e resistência vascular, foram avaliadas através de colorações

específicas para fibras elásticas (coloração de Weigert) e para fibras colágenas (coloração de Picrossirius).

4.9.1 Análise das lamelas elásticas

Para esta análise, foi usada a coloração de Weigert, que ressalta a presença das lamelas elásticas. Desta forma, foi possível estabelecer se os tratamentos levam a uma alteração da quantidade de lamelas elásticas e consequentemente da disposição e número de células musculares lisas. Desta forma, é possível avaliar se um possível remodelamento vascular foi acompanhado por uma adaptação correspondente do sistema elástico, potencialmente mudando a complacência vascular.

Para esta avaliação, foram corados 10 cortes de aorta e de coração para cada animal, sendo avaliados ao menos 5 cortes de aorta e entre 6 e 10 cortes de artérias cardíacas por animal. A Figura 4 apresenta um esquema de como são visualizadas as lamelas elásticas nos vasos. Como as artérias cardíacas são vasos de resistência (musculares), apresentam proporcionalmente menos lamelas elásticas, não observando-se necessariamente a lâmina elástica externa ou outras lamelas entre as células musculares. Todas as análises morfométricas foram realizadas em um sistema computadorizado acoplado ao microscópio (AxioCam MRc, ZEISS), com um programa específico para captura e análise de imagens (Axion Vision 4.8).

A análise foi realizada de maneira a visualizar os vasos em maior aumento (400x) e virtualmente dividi-lo em quatro áreas, contando assim o número de lamelas elásticas por quadrante e a média dos mesmos.

Figura 4 – Esquema didático de visualização de artéria corada por Weigert

Esquema de corte da artéria e estruturas vasculares estudadas. A = Adventícia; B = Lâmina Elástica Externa; C = Lâmina Elástica Interna; Em azul, representação das fibras elásticas.

4.9.2 Análise das fibras colágenas

Para esta análise, foi usada a coloração de Picrossirius, que ressalta a presença e disposição de fibras colágenas. A coloração Picrossírius é um método muito eficiente e simples para localizar e caracterizar o colágeno presente em diferentes tecidos, permitindo observar as relações existentes entre morfologia e histoquímica (JUNQUEIRA et al., 1991). Este método foi utilizado para avaliar deposição perivascular de fibras colágenas dos vasos estudados.

Esta coloração permite o estudo das fibras colágenas sob dois pontos de vista: a disposição e presença de fibras colágenas em torno do vaso pela visualização em campo claro e a diferenciação tecidual dos tipos de fibras, através da birrefringência do colágeno, capaz de desviar o feixe de luz polarizada. Assim, a luz, emitida pelo microscópio em uma única direção (e não observada pelo olho humano) é desviada de forma diferente, conforme o calibre da fibra colágena, sendo visualizada em cores diferentes. Assim, a fibra fina (composta por colágenos de fibras mais finas como o colágenos do tipo III ou a fibra menos madura) é vista em tons verdes, a fibra mais espessa (de colágenos mais espessos como o colágeno do tipo I ou fibras mais

maduras) é vista em tons vermelhos, enquanto as fibras de espessura intermediária são vistas em tons amarelos.

A avaliação em campo claro consiste na medida da área em torno da adventícia, menos a área da lâmina elástica externa; assim, define-se especificamente a área da túnica adventícia. Tomamos o cuidado de medir o diâmetro do vaso (maior medida) no menor eixo (reduz o erro de medida, caso a artéria não seja fixada totalmente aberta e fique achatada). Essa medida foi usada para dividir o valor obtido da área da adventícia, de forma a ter-se uma medida de área da túnica proporcional ao diâmetro do vaso. Esta avaliação é mais importante para artérias que podem se apresentar com diferentes calibres e, proporcionalmente, mudam o tamanho de adventícia.

Figura 5 - Análise de Coloração Picrossirius – Campo Claro

Esquema de corte e avaliação da artéria para fibras colágenas. A = Adventícia; B = Lâmina Elástica Externa; C = Lâmina Elástica Interna; D = Maior medida do menor eixo.

Já a avaliação sob luz polarizada consistiu em quantificar separadamente as fibras colágenas mais espessas (amarelas e vermelhas) e as mais finas (verdes, menos maduras).

4.10 Análise Estatística

Os resultados são expressos como média $\pm$ DPM. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de 2 fatores (sexo e tempo de tratamento, sendo o grupo controle equivalente a tempo zero de sobrecarga), complementada pelo teste de Bonferroni. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

A seguir, são apresentados os resultados obtidos para as avaliações relacionadas à morfometria corporal, ao controle hemodinâmico, hidroeletrolítico e ao remodelamento vascular. Os valores são apresentados em média $\pm$ desvio padrão da média. Como descrito na metodologia, foram avaliados grupos de camundongos C57Bl/6 machos e fêmeas, dispostos em grupos controle e com sobrecarga salina de 1% (2 e 12 semanas), como segue:

- 1) Macho controle (Cont M) – n=9
- 2) Macho salina de 2 semanas (Sal2 M) – n=10
- 3) Macho salina de 12 semanas (Sal12 M) – n=10
- 4) Fêmea controle (Cont F) – n=10
- 5) Fêmea salina de 2 semanas (Sal2 F) – n=10
- 6) Fêmea salina de 12 semanas (Sal12 F) – n=10

5.1 Medidas morfométricas corporais

5.1.1 Medidas corporais

Foi observado que os machos apresentaram peso corporal maior que as fêmeas (Figura 6). Por outro lado, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas nem entre os grupos de machos, nem entre grupos de fêmeas.

Figura 6 - Medida de peso corporal semanal

Valores dos pesos corporais de acordo com os grupos experimentais. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo controle e # $p \leq 0,05$ quando comparado aos seus respectivos grupos temporais em fêmeas (Sal2 F e Sal12 F).

Resultado semelhante foi observado quando foram comparadas as médias do comprimento naso-anal (Figura 7). Novamente, os machos apresentaram comprimento maior que as fêmeas, enquanto não foram observadas diferenças nem entre os grupos de machos, nem entre grupos de fêmeas.

Figura 7 - Comprimento naso-anal

Valores de comprimento naso-anal dos grupos de acordo com os tempos de tratamento.

5.1.2 Avaliação do peso do coração

Quando comparamos os valores percentuais da razão entre o peso do coração e o peso corporal dos grupos estudados, observamos um comportamento diferente entre machos e fêmeas em resposta à sobrecarga salina. Podemos observar, na Figura 8, que os machos apresentam aumento no peso do coração após 2 semanas de sobrecarga salina (condição mais aguda), retornando a relação percentual a valores semelhantes dos animais controle quando a sobrecarga salina foi mantida por 12 semanas. Por outro lado, as fêmeas não mostraram alteração da relação percentual após 2 semanas de sobrecarga salina; porém, em condição mais crônica de sobrecarga salina (12 semanas), apresentam aumento significativo.

Figura 8 – Relação entre peso do coração pelo peso corporal

Valores médios da razão peso do coração/peso corporal dos grupos avaliados. * $p \leq 0,05$ quando comparado aos seus respectivos grupos controle ; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Sal2 M.

A partir de resultados iniciais obtidos após a normalização pelo peso corporal, apresentou-se como questionamento se essa relação entre peso cardíaco e peso corporal não poderia se dever a um ganho ou perda de peso em decorrência do tratamento. Dessa forma, fizemos também a razão entre peso cardíaco e comprimento naso-anal, que diz respeito ao crescimento do animal, ganhando ou não mais peso, e possivelmente se mantém mais constante. De forma interessante, verificou-se que as mesmas respostas ao tratamento foram obtidas normalizando os dados das duas formas.

Figura 9 – Relação entre peso do coração pelo comprimento naso-anal

Valores médios da razão peso do coração/comprimento naso-anal dos grupos de acordo com os tempos de tratamento. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo controle; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Sal2 M e ** $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Sal12 M.

5.1.3 Avaliação do peso renal

Ao verificarmos a relação entre o peso renal e o peso corporal (Figura 10), observamos que o tempo de sobrecarga salina também influenciou no aumento do peso renal tanto em machos como em fêmeas, aumento que se mostrou significativo em machos após 12 semanas de tratamento, mas em fêmeas mais agudamente, logo com 2 semanas. Ao normalizar a relação entre peso renal e comprimento naso-anal (Figura 11), observamos resultado semelhante ao da Figura 10, em relação ao tempo de sobrecarga salina crônica (12 semanas), porém nesta medida observamos que machos e fêmeas respondem diferentemente de maneira significativa, os machos tendem a ter um aumento maior do que as fêmeas num mesmo período de tratamento, além disso o aumento do peso renal em 12 semanas também se mostrou significativo se comparado ao aumento de peso com 2 semanas de tratamento, o que não ocorreu nas fêmeas.

Figura 10 - Relação entre peso do rim pelo peso corporal

Valores médios da razão rins/peso corporal dos grupos de acordo com os grupos avaliados

Figura 11 – Relação entre peso do rim pelo comprimento naso-anal

Relação entre o peso renal e a medida de comprimento naso-anal. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo controle; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Sal2 M e ** $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Sal12 M.

5.2 Avaliação Metabólica

5.2.1 Consumo hídrico e excreção urinária

Como pode ser verificada na Figura 12, a sobrecarga salina levou a um aumento da ingestão de água tanto em machos como em fêmeas. O aumento na ingestão de água pode ser verificado já em 2 semanas de tratamento, mantendo-se elevado após 12 semanas de sobrecarga salina.

Figura 12 - Volume de água ingerida

Valores de consumo de água/dia dos grupos de acordo com os grupos experimentais * $p \leq 0,05$ quando comparado aos seus respectivos grupos controle.

A Figura 13 apresenta os valores médios de excreção diária de urina medidos nos grupos estudados. Pode-se verificar que, tanto nos machos como nas fêmeas, ocorre aumento na produção de urina após 2 semanas de sobrecarga salina, sendo este mantido após 12 semanas. Contudo, o aumento observado nas fêmeas foi menor e não significativo.

Figura 13 - Volume de urina excretada

Valores de diurese dos grupos de acordo com os tempos de tratamento. * $p \leq 0,05$ quando comparado aos demais grupos.

Apesar de tanto machos como fêmeas terem consumo hídrico aumentado e aumento no volume de urina excretada, os machos aumentam a retenção de volume em 51 e 53% após 2 e 12 semanas (respectivamente), por outro lado, as fêmeas apresentam retenção de volume grande (145 e 138% após 2 e 12 semanas, respectivamente), estes dados podem ser visualizados na Tabela 2 em ANEXOS.

5.2.2 Dosagem urinária de sódio, potássio, cloreto, proteínas totais, creatinina e uréia.

A avaliação da dosagem de sódio (Figura 14), cloreto (Figura 15) e potássio (Figura 16) urinários mostra que ocorre um aumento da excreção de sódio, especialmente evidente nos grupos com 2 semanas de tratamento, tanto em machos quanto em fêmeas. Com relação ao cloreto urinário, observamos que não houve alteração em seus níveis com relação ao grupo dos machos; já quando observamos as fêmeas, verificamos aumento relevante no grupo tratado com sobrecarga salina por 12 semanas. Ao observar os níveis de potássio, verificamos que tanto em machos quanto em fêmeas há uma redução considerável com 2 semanas de tratamento, mas esta redução tende a retornar aos níveis iniciais quando o tratamento é prolongado por 12 semanas.

Figura 14 - Quantidade de sódio urinário

Valores de sódio urinário dos grupos de acordo com os tempos de tratamento. * $p \leq 0,05$ quando comparado aos seus respectivos grupos controles.

Figura 15 - Quantidade de cloreto urinário

Valores de cloreto urinário dos grupos de acordo com os tempos de tratamento. * $p \leq 0,05$ quando comparado aos seus respectivos controles

Figura 16 - Quantidade de potássio urinário

Valores de potássio urinário dos grupos de acordo com os tempos de tratamento. * $p \leq 0,05$ quando comparado aos seus respectivos controles

Ao observarmos os resultados com relação às proteínas totais encontradas na urina (Figura 17), verificamos uma redução importante no grupo das fêmeas, especialmente com 2 semanas de tratamento com sobrecarga salina, diferindo do grupo dos machos, onde a quantidade de proteínas totais excretadas aumentou com o tempo de tratamento.

A avaliação dos valores de creatinina urinária (Figura 18) nos mostrou redução no grupo dos machos, significativamente com 12 semanas de tratamento. As fêmeas também apresentam perfil de redução, ainda que não significante, logo com 2 semanas de tratamento, retomando aos índices iniciais com 12 semanas de tratamento.

Os dados de uréia (Figura 19) obtidos não revelaram diferença significativa entre os grupos, apesar de apresentar redução em relação ao grupo controle nos machos e nas fêmeas num primeiro momento. Após 12 semanas de tratamento observamos que os níveis de uréia excretada retomam aos índices iniciais e apresentam até mesmo tendência ao aumento, em relação ao grupo controle.

Figura 17 - Proteínas Totais Urinárias

Valores de proteína total urinária dos grupos de acordo com os tempos de tratamento.

$p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Sal2 M.

Figura 18 - Creatinina Urinária

Valores de creatinina urinária dos grupos de acordo com os tempos de tratamento.

* $p \leq 0,05$ quando comparado aos demais grupos.

Figura 19 – Uréia

Valores de uréia dos grupos de acordo com os tempos de tratamento

5.2.3 Hematócrito e avaliação sérica de sódio, cloreto e creatinina

Corroborando os dados de peso corporal, também não observamos diferença no hematócrito dos grupos estudados tanto de machos como de fêmeas (Figura 20). Além disso, não verificamos diferenças entre machos e fêmeas. Estes resultados também vão de acordo com as medidas de eletrólitos séricos, apresentados a seguir.

Figura 20 – Hematócrito

Valores de hematócrito dos grupos experimentais.

A avaliação da dosagem de sódio (Figura 21) e cloreto (Figura 22) no soro nos mostrou que não ocorreram diferenças significantes nem entre os tratamentoss e nem entre machos e fêmeas.

A dosagem sérica para os níveis de creatinina (Figura 23) também não mostrou diferença significativa nem no grupo dos machos e nem no grupo das fêmeas, apesar de demonstrar tendências de diminuição ao longo do tempo de tratamento nos dois grupos.

Figura 21 – Dosagem de sódio no soro

Valores de sódio no soro dos grupos experimentais.

Figura 22 - Dosagem de cloreto no soro

Valores de cloreto no soro dos grupos experimentais.

Figura 23 – Dosagem de creatinina no soro

Valores de creatinina no soro dos grupos experimentais

Corroborando a este dado, o clearance de creatinina (Figura 24) também não mostrou diferença significativa entre os grupos e tempos, demonstrando assim que tanto machos como fêmeas ainda mantêm seu funcionamento fisiológico renal ideal.

Figura 24 – Clearance de creatinina

Valores de clearance de creatinina dos grupos de acordo com os tempos de tratamento.

5.3 Avaliação hemodinâmica

Embora os grupos tratados com sobrecarga salina tenham apresentado alteração na ingestão de água e excreção de urina, interessante, não observamos diferenças hemodinâmicas importantes. Tanto os valores de PA (Figura 25) como os de FC (Figura 26) não mostram alteração quando comparamos os grupos controle com os que receberam a sobrecarga salina.

Figura 25 - Medida de pressão arterial sistólica frequência cardíaca

Valores médios da pressão arterial caudal (A) e da frequência cardíaca (B) dos grupos de acordo com os tempos de tratamento.

5.4 Avaliação do remodelamento de MEC vascular

5.4.1 Avaliação das lamelas elásticas

A avaliação das lamelas elásticas em artérias elásticas, como a aorta analisada (Figura 27) mostrou que os machos respondem ao estresse da sobrecarga salina após 12 semanas de tratamento, aumentando o número de lamelas elásticas em sua parede vascular. Já as fêmeas mostram aumento semelhante, porém com 2 semanas de sobrecarga salina, aumentando ainda mais com o tratamento prolongado (12 semanas).

Figura 26 - Lamelas Elásticas da Aorta

(A) Contagem de lamelas elásticas da aorta nos grupos estudados. (B) Aortas de camundongos C57Bl/6 fêmeas coradas por Weigert Van Gieson. As setas indicam as lamelas elásticas.

Quando avaliamos as lamelas elásticas das artérias cardíacas (Figura 29), podemos verificar que a sobrecarga salina não levou a alterações nem em período mais curto, nem em período mais crônico. Além disso, não verificamos diferença na resposta observada entre machos e fêmeas. Estes resultados eram esperados, visto que tais artérias, consideradas de resistência (musculares) podem responder seja modificando seu conteúdo celular (células musculares lisas), seja modificando a produção de matriz extracelular, especialmente as fibras colágenas.

Figura 27 - Lamelas Elásticas em Artérias Cardíacas

Contagem de lamelas elásticas das artérias cardíacas em função dos grupos estudados.

5.4.2 Avaliação das fibras de colágeno

Quando observamos a deposição de fibras colágenas ao redor do vaso (perivascular) em artérias cardíacas (Figura 30), notamos interessante resultado no grupo dos machos, onde com a sobrecarga salina independentemente do tempo de tratamento, a deposição de fibras colágenas diminui significativamente em relação ao grupo que não recebeu a sobrecarga salina (Cont M). Interessante também foi notar a resposta diferente entre machos e fêmeas, onde estas, mesmo não significativamente, demonstram ter aumento na deposição de fibras colágenas com o tempo de sobrecarga.

Em relação a deposição perivascular em aortas (Figura 31), observamos que diferentemente das artérias cardíacas, a deposição tende ao aumento tanto em machos como em fêmeas de acordo com o tempo de tratamento, sendo a deposição nas fêmeas considerada significativamente mais tardia em relação ao grupo dos machos.

Figura 28 – Relação entre colágeno perivascular e diâmetro em artérias cardíacas

Análise da relação da deposição de fibras colágenas perivascular em relação ao diâmetro do vaso. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Cont M.

Figura 29 – Relação entre colágeno perivascular e diâmetro em aortas

Análise da relação da deposição de fibras colágenas perivascular em relação ao diâmetro do vaso. * $p \leq 0,05$ em relação ao seus respectivos grupos controle.

Quando os vasos corados para picrossirius são estudados em luz polarizada (possibilitando distinguir as fibras de colágeno pelo seu diâmetro), observamos que em artérias cardíacas (Figura 3), apesar de a deposição perivascular ter diminuído em machos, as fibras intermediárias de colágeno (barras amarelas) aumentaram significativamente em relação ao grupo controle. As fêmeas apresentaram aumento significativo em fibras espessas (barras vermelhas), quando comparadas ao grupo controle e aumento significativo em fibras intermediárias quando comparado ao tempo de sobrecarga com os machos.

Quando analisamos as fibras de colágeno em luz polarizada em aortas (Figura 32), encontramos um perfil semelhante, porém, os machos apresentam aumento não apenas de fibras intermediárias, mas também de fibras espessas de colágeno após 12 semanas de tratamento. Por sua vez as fêmeas apresentam maior quantidade de fibras intermediárias. Se comparadas aos machos em relação ao tempo de tratamento, as fêmeas mostraram aumento significativo de fibras finas (barras verdes) logo com 2 semanas de tratamento e após 12 semanas, aumento significativo em fibras espessas.

Figura 30 – Análise das diferentes espessuras de fibras de colágeno em artérias cardíacas.

Análise das diferentes espessuras de fibras de colágeno em artérias cardíacas, onde verde representa as fibras mais finas de colágeno; amarelo, as fibras intermediárias; vermelho, as fibras mais espessas. * $p \leq 0,05$, quando comparado aos seus respectivos grupos controle.

Figura 31 – Análise das diferentes espessuras de fibras de colágeno em aorta.

Análise das diferentes espessuras de fibras de colágeno em aorta, onde verde representa as fibras mais finas de colágeno; amarelo, as fibras intermediárias; vermelho, as fibras mais espessas. * $p \leq 0,05$, quando comparado aos seus respectivos grupos controle e # $p \leq 0,05$ quando comparados os tempos semelhantes entre fêmeas e machos.

Figura 32 – Fotomicrografias representativas de artérias cardíacas de camundongos coradas por Picrossirius.

Fotomicrografias representativas de artérias cardíacas de diâmetro superior a 50µm de camundongos C57Bl/6 machos coradas por Picrossirius. À esquerda, visualização em campo claro e à direita, visualização em capo escuro.

Figura 33 – Fotomicrografias representativas de artérias cardíacas de camundongos coradas por Picrossirius.

Fotomicrografias representativas de artérias cardíacas de diâmetro superior a 50µm de camundongos C57Bl/6 fêmeas coradas por Picrossirius. À esquerda, visualização em campo claro e à direita, visualização em capo escuro.

Figura 34 – Fotomicrografias representativas de aortas de camundongos coradas por Picrossirius.

Fotomicrografias representativas de aortas de camundongos C57Bl/6 machos coradas por Picrossirius. À esquerda, visualização em campo claro e à direita, visualização em capo escuro.

Figura 35- Resumo dos resultados obtidos

	Controle Machos	Sal 2 Machos	Sal 12 Machos	Controle Fêmeas	Sal 2 Fêmeas	Sal 12 Fêmeas
Peso	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Naso-Anal	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Consumo de água		↑	↑		↑	↑
Excreta de urina		↑	↑			
PA	-	-	-	-	-	-
FC	-	-	-	-	-	-
Sódio urinário		↑	↑		↑	↑
Cloreto urinário	-					↑
Potássio urinário		↓				
Sódio no soro	-	-	-	-	-	-
Cloreto no soro	-	-	-	-	-	-
Proteínas totais na urina					↓	↓
Creatinina urinária			↓			
Hematócrito	-	-	-	-	-	-
Razão peso do coração/ Peso corporal		↑	↓			↑
Lamelas elásticas na aorta	-	-	-	-	-	-
Lamelas elásticas nas artérias cardíacas	-	-	-	-	-	-
Deposição de fibras colágenas em		↓	↓			↑

artérias cardíacas						
Deposição de fibras colágenas na aorta		↑	↑			↑
Fibras colágenas espessas em artérias cardíacas			↑			↑
Fibras colágenas intermediárias em artérias cardíacas		↑			↑	
Fibras colágenas finas em artérias cardíacas		↑	↑		↑	↑
Fibras colágenas espessas na aorta			↑			↑
Fibras colágenas intermediárias na aorta		↑				↑
Fibras colágenas finas na aorta		↑			↑	

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem melhor entender alguns mecanismos relacionados às adaptações à sobrecarga salina, mesmo em ausência de hipertensão. Este tipo de estudo se torna importante no momento em que se observa o aumento do consumo de alimentos ricos em sódio na população. A ideia de que o excesso de sódio na dieta não traria problemas aparentes pela manutenção da normalidade dos níveis pressóricos hoje tem sido vista com bastante cuidado. O presente estudo procurou aprofundar o conhecimento neste sentido, e apresenta, entre seus principais resultados que a sobre carga salina 1% leva: 1) ao aumento de peso corporal em machos; 2) ao aumento da massa cardíaca especialmente em fêmeas e ao aumento da massa renal tanto em machos como em fêmeas; 3) ao aumento da ingestão de água e de excreção de urina, concomitante ao aumento da concentração de eletrólitos urinários e manutenção dos eletrólitos séricos; 4) ao aumento da proteinúria, sem alteração importante do clearance de creatinina; 5) a modificações na estrutura da parede arterial, especialmente na matriz colágena, mesmo que sem modificação da pressão arterial.

A seguir, procuraremos discutir os resultados principais, apresentados em: morfometria corporal, controle hidroeletrolítico, controle hemodinâmico e remodelamento vascular.

Avaliação morfométrica corporal

Esta avaliação nos permitiu verificar se os grupos estudados estavam ganhando peso, seja por acúmulo de líquidos, seja por aumento de massa corporal. Era de se esperar que os machos apresentassem peso corporal maior que as fêmeas, como referido em diversos estudos (WU, et al.,2013; IGNACIO, et al.,2013). O fato de não vermos um aumento de peso estatisticamente significativo nos machos se comparados às fêmeas pode se dever à idade, visto que esses animais terminaram o protocolo com 16 semanas de idade. Por outro lado, verificamos que os machos submetidos à sobrecarga salina apresentaram aumento significativo de peso corporal recebendo a sobrecarga tanto por 2 como por 12 semanas. Essa diferença se deu tanto em relação

aos machos do grupo controle como em relação às fêmeas, indicando que, de alguma forma, os animais ganharam massa corporal ou retiveram mais líquidos. Em trabalhos realizados anteriormente em ratos, não verificamos aumento significativo de peso nem após 6 semanas (LACCHINI et al., 2001) e nem após 12 e 18 meses (LACCHINI et al., 1997; LACCHINI, et al., 2002). Embora estes e outros estudos não tenham mostrado aumento de peso corporal nestes animais, a mudança do modelo experimental pode ser determinante para este padrão de resposta diferente. Além disso, quando verificamos que o comprimento naso-anal não difere entre os grupos tratados, observa-se que os animais crescem de forma homogênea e que possivelmente está ocorrendo ganho de massa corporal ou acúmulo de líquidos nestes animais (GUYTON, et al., 1970 HE, et al., 2011).

É interessante observar que tanto machos como fêmeas apresentaram resposta hipertrófica cardíaca e renal ao tratamento com sobrecarga salina, tanto se normalizados pelo peso corporal como pelo comprimento naso-anal, independente de fatores hemodinâmicos, como já demonstrado anteriormente em alguns estudos (BURNIER, et al., 2007; MAZZOLAI, et al., 2000). No caso dos machos, houve um aumento da massa cardíaca precocemente (em 2 semanas), sendo esta normalizada em tempo mais crônico. Já as fêmeas apresentaram apenas resposta mais tardia, porém mais consistente. O retorno da massa cardíaca a condições semelhantes ao grupo controle em períodos mais crônicos pode indicar um processo adaptativo diverso entre machos e fêmeas. Quando avaliamos a massa renal, pode-se observar que tanto machos quanto fêmeas, respondem à sobrecarga salina com hipertrofia renal. Essa hipertrofia pode estar associada ao aumento da excreção de urina e de eletrólitos urinários (CORDAILLA, et al., 2005). Contudo, se faz necessário um estudo mais aprofundado sobre as modificações da morfologia renal relacionadas a esta hipertrofia.

Avaliação do controle hidroeletrolítico

O controle hidroeletrolítico foi avaliado pela obtenção de dados em gaiola metabólica e no soro. Os resultados obtidos mostram que a sobrecarga salina leva ao aumento da ingestão de água tanto em machos (95 e 100% após 2 e 12 semanas,

respectivamente) como em fêmeas (47 e 53% após 2 e 12 semanas, respectivamente), e que este já ocorre em período mais curto, de 2 semanas. Essa observação corrobora com diversos outros estudos, que mostram o aumento da ingestão hídrica tanto em períodos mais precoces como em períodos mais crônicos (BACHMANOV, et al., 2002; JOHSON, et al. 2003). Coerente com o aumento da ingestão hídrica, observamos aumento também do volume de urina excretada. Contudo, esse aumento foi significativo apenas nos machos, onde observamos aumentos de 107 e 114% após 2 e 12 semanas (respectivamente). Já as fêmeas apresentaram aumento menor no volume de urina (21 e 30% após 2 e 12 semanas, respectivamente). A ideia de que o aumento de ingestão hídrica nas fêmeas seja menor pode ser devida a diferenças metabólicas determinadas pelos hormônios sexuais (BEGG, et al., 2012). Contudo, era de se esperar que o aumento no volume de urina nas fêmeas fosse maior que 21 e 30%. Como pode ser verificado na tabela 2 (ANEXOS), o volume retido (volume ingerido - volume excretado) nos grupos controle mostra que machos e fêmeas retêm volumes semelhantes, possivelmente perdidos nas fezes e pela respiração. Porém, quando estes animais recebem a sobrecarga salina, os machos aumentam a retenção de volume em 51 e 53% após 2 e 12 semanas (respectivamente), o que é condizente com o aumento do peso corporal ao final do estudo. Por outro lado, as fêmeas apresentam retenção de volume grande (145 e 138% após 2 e 12 semanas, respectivamente), que ajuda a entender porque o volume urinário não aumentou com a mesma magnitude que nos machos. Porém, podemos questionar o que está acontecendo com esse volume ingerido e não urinado, especialmente porque estas fêmeas não apresentaram aumento de peso, além disso alguns estudos têm mostrado que a ingestão de uma quantidade maior de sódio pode não levar ao acúmulo de líquido nos tecidos (HEER, et al., 2000; TITZE, et al., 2008) . O que podemos inferir que esteja acontecendo é um aumento na perda de líquido seja pelas fezes, seja pela respiração (KERPEL-FRONIUS, et al. 1970; PALACIOS, et al., 2004).

Como era de se esperar, verificamos aumento sódio excretado na urina tanto em machos como em fêmeas. Como estes animais, ao receberem sobrecarga salina, precisam eliminar o excesso de líquido e de sal, a resposta normal é de aumento tanto de volume de urina como de sódio excretado (GUPTA, et al., 2011). Era de se esperar

que houvesse aumento de cloreto excretado, mas este foi verificado apenas em fêmeas. Por outro lado, também é esperada a redução de potássio urinário, devido ao mecanismo de troca de sódio e potássio, mas esta foi verificada apenas em machos. A avaliação de proteínas totais chama a atenção especialmente para os machos, que mostraram proteinúria, a alta ingesta de sal pode levar a proteinúria e consequente lesão renal, principalmente em indivíduos hipertensos (WEIR, et al., 1998).

A avaliação sérica mostrou que tanto machos como fêmeas foram capazes de manter constantes os valores séricos de sódio e cloreto, sugerindo o funcionamento renal adequado. Estes dados estão em concordância com trabalhos anteriores (LACCHINI, et al., 1999) mostrando que um indivíduo normotenso é capaz de manter o controle hidroeletrolítico. Além disso, tanto o hematócrito quanto o clearance de creatinina não apresentaram variação entre os grupos, confirmando este controle renal adequado nos dois tempos estudados.

Avaliação hemodinâmica

Considerando que os grupos estudados apresentam um controle hidroeletrolítico adequado e ainda apresentam a função renal capaz de manter as variáveis sanguíneas estudadas estáveis, seria coerente encontrarmos a pressão arterial normal. Neste sentido, observamos que não há alteração da pressão arterial e nem da frequência cardíaca seja comparando machos e fêmeas, seja comparando os tempos de sobrecarga salina. Como estes animais terminaram o protocolo experimental ainda jovens (com 4 meses de idade), é coerente não observarmos diferenças de pressão arterial importantes (SANDBERG; JI, 2012). Por outro lado, há poucos estudos avaliando a sobre carga salina em camundongos. O que se conhece em ratos é que a sobrecarga salina 1% na água para beber não modifica de forma importante a pressão arterial nem após 1 semana (LACCHINI, et al., 1997), nem após 6 semanas (LACCHINI, et al. 2001) ou após 12 meses de sobrecarga (LACCHINI, et al., 2002).

Muitos estudos têm avaliado os efeitos da sobrecarga salina na dieta, desde a ingestão de solução salina 1% (NORMAN, et al., 1975; KAZI, et al., 2009) até a ingestão de sobrecarga salina de 4 a 8% na ração (HE, et al., 2013). Dentro deste

conceito de níveis mais altos de sobrecarga salina, podemos observar que os animais têm seu nível de pressão arterial elevado dependendo do tempo e da magnitude da sobrecarga, auxiliando no estudo específico de doenças cardiovasculares e sua fisiologia. Porém, a grande quantidade de NaCl, torna o sabor da água de beber desagradável, fazendo com que a análise da ingesta de água não seja fidedigna. Como solução ao problema, muitos pesquisadores realizam a sobrecarga salina na ração do animal, sendo a alta concentração de sal faz com que os animais tenham sede, ingerindo grande quantidade de água e consequentemente aumentando volume plasmático, débito cardíaco e PA. O grande questionamento sobre este tipo de estudo, é que além da avaliação hemodinâmica, o animal pode desenvolver câncer gástrico, influenciando todo o estudo proposto. O nosso estudo visa estudar a sobrecarga salina em níveis mais próximos da realidade do ser humano, e por isso, a escolha de 1% de NaCl. Neste caso, não sendo o animal sal-sensível (DAHL, et al., 1967), este tem capacidade de excretar o excesso de sal e de água, evitando o aumento do volume plasmático e, consequentemente, da pressão arterial.

Remodelamento da MEC Vascular

Ao observarmos os dados com relação à morfometria vascular, verificamos alterações significantes em diferentes tipos de vasos (elástico e de resistência), alterações diferentes em machos em relação às fêmeas e em diferentes tempos de tratamento. Vale lembrar que todas estas alterações são independentes de fatores hemodinâmicos, como já referido em estudos anteriores (FERREIRA, et al., 2010).

Ao analisarmos e compararmos as diferentes respostas em relação ao tipo de vaso, foram observados alguns fatores relevantes. Artérias elásticas, como no caso a aorta, tendem a aumentar sua elasticidade nos machos após 12 semanas de sobrecarga salina; já nas fêmeas, este aumento se dá com 2 semanas de tratamento. Da mesma forma, quando analisamos a deposição de fibras colágenas perivasculares nesta mesma artéria, observamos que os machos também apresentam aumento de sua deposição de fibras, especialmente fibras mais espessas, ou seja, que oferecem rigidez, como verificado em outros estudos (SAFAR, et al., 2000). O vaso, portanto,

parece apresentar maior elasticidade, procurando contrabalançar a maior rigidez. As fêmeas apresentam um padrão de resposta na aorta semelhante aos machos; contudo, não só apresentam aumento na deposição de fibras espessas de colágeno como de fibras intermediárias, sugerindo uma maior rigidez nestes vasos.

Quando observamos vasos de resistência, como as artérias cardíacas, verificamos um padrão de resposta diverso dos vasos elásticos. Tanto em machos como em fêmeas, não ocorre alteração no número de lamelas elásticas, o que seria esperado, visto que estas artérias são de resistência. Além disso, verificamos que a deposição de fibras colágenas se apresenta diminuída nos machos, ocorrendo um aumento na proporção de fibras intermediárias. Este aumento pode representar um mecanismo compensatório para manter a estabilidade da parede arterial, e vai de acordo com os resultados obtidos por outros grupos em artérias carótidas (LABAT, et al., 2001), que observar. Por outro lado, as fêmeas apresentaram um padrão de resposta diferente, com aumento na deposição tanto de fibras espessas como de fibras intermediárias, o que sugere um aumento da rigidez arterial. Neste caso, os resultados obtidos indicam uma possível predisposição nas fêmeas a apresentar pior resposta vascular frente a um estímulo estressor como a sobrecarga salina.

Diversos estudos têm mostrado o impacto da alta ingestão de sódio na dieta sobre o funcionamento de diversos tecidos e funcionamento de diferentes sistemas. Neste contexto, tem-se mostrado o efeito da sobrecarga salina levando à reabsorção óssea e perda proteica (FRINGS-MEUTHEN et al., 2011), ao remodelamento cardíaco (GAO, et al., 2001), à inflamação (SHEN et al., 2008) e fibrose renal (YU et al., 1998; ZHANG et al., 2004), entre outros, concomitantemente ou não com a presença de hipertensão. Os resultados do presente estudo ajudam a melhorar a compreensão dos efeitos da sobrecarga salina sobre a estrutura vascular, trazendo informações relevantes tanto em machos como em fêmeas.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que a sobrecarga salina 1% na água de beber:

- não induziu elevação na pressão arterial após 2 ou 12 semanas de tratamento, sugerindo que as observações feitas se dão de forma independente do desenvolvimento de hipertensão;
- induz adaptações renais para excretar o excesso de sódio e volume ingerido, levando, nos machos, a uma proteinúria, considerada um marcador inicial de lesão renal;
- induz respostas adaptativas vasculares diferentes em machos (associadas a artérias elásticas) em relação às fêmeas (associadas a artérias de resistência), levando a um processo sugestivo de enrijecimento arterial.

Perspectivas futuras

Os resultados deste estudo trouxeram fortes indícios de que a sobrecarga salina pode aumentar a susceptibilidade cardiovascular e renal, mesmo sem induzir, num primeiro momento, aumento de pressão arterial. Essa ideia vai de encontro com diversas observações feitas em estudos populacionais e nos leva a pensar em diversas avaliações que se fazem necessárias para melhor compreender este processo, como:

- ✓ Aprofundar a avaliação do efeito da sobrecarga salina sobre a função e a morfologia renal, especialmente sobre a barreira de filtração renal;
- ✓ Aprofundar o conhecimento dos mecanismos envolvidos no controle da pressão arterial e no controle hidroeletrolítico em camundongos com sobrecarga salina;

Aprofundar o estudo sobre os mecanismos pelos quais a sobrecarga salina induz o remodelamento de matriz extracelular perivascular, especialmente na matriz colágena, dando ênfase à participação do sistema renina-angiotensina.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

BOSMAN, F.T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* v.200, p.-423-428. 2003.

BURNIER, M.; PHAN, O.; WANG, Q. High salt intake: a cause of blood pressure-independent left ventricular hypertrophy?. **Nephrol. Dial. Transplant.** v.22. p.2426–2429. 2007.

COLEMAN , T.G.; GUYTON, A.C. Hipertension caused by salt loading in the dog – III onset transient of cardiac outout and other circulatory variables. **Circ. Res.** v. 25.p. 153-160. 1969.

CORDAILLA, T. M.; RUGALE, C.; CASELLAS, D.; MIMRAN, A.; JOVER, B. Cardioresnal abnormalities associated with high sodium intake: correction by spironolactone in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v.289.p.R1137-1143. 2005.

COWLEY, Jr. A.W.; SKELTON, M.M.; MERRIL, D.C. Osmoregulation during higt salt intake: relative importance of drinking and vasopressin secretion. **Am. J. Physio.** v.20.p. R878-886.1986

COWLEY, Jr. A.W.; SKELTON, M.M.; MERRIL, D.C.; QUILLEN, E.W.; SWITZER, S.J. Influence of daily sodium intake on vasopressin secretion and drinking in dogs. **Am. J. Physiol.** v.245.p. R860-872. 1983.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DEBING, E.; PEETERS, E.; DUQUET, W.; POPPE, K.; VELKENIERS, B.; VAN DEN BRANDE, P. Endogenous sex hormone levels in postmenopausal women undergoing carotid artery endarterectomy. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 156, p. 687-693, 2007.

EAKER, E. D.; CHESEBRO, J. H.; SACKS, F. M.; WENGER, N.K.; WHISNANT, J. P.; WINSTON, M. Cardiovascular disease in women. **Circulation**, v. 88, n. 4, p. 1, 1993.

ELLIOTT, J.T. et al. Vascular smooth muscle cell response on thin films of collagen. **Matrix Biol.** v.24.p. 489-502. 2005.

FERREIRA, D. N.; KATAYAMA, I. A.; OLIVEIRA, I. B.; ROSA, K. T.; FURUKAWA, L. N.; COELHO, M. S.; CASARINI, D. E.; HEIMANN, J. C. Salt-induced cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis are due to a blood pressure-independent mechanism in Wistar rats. **J. Nutr.** v.140. p. 1742-1751. 2010.

FITZSIMMONS, C.M.; SHANAHAN, C.M. Vascular extracellular matrix. In: LANZER, P.; TOPOL, E.J. (Eds.). **Panvascular medicine**. Berlin-New York: Springer.p.217-231. 2002.

FRINGS-MEUTHEN, P.; BUEHLMEIER, J.; BAECKER, N.; STEHLE, P.; FIMMERS, R.; MAY, F.; KLUGE, G.; HEER, M. High sodium chloride intake exacerbates immobilization-induced bone resorption and protein losses. **J. Appl. Physiol.**v.111.p.537-542.2011.

GAO, F.; HAN, Z.Q.; ZHOU, X.; SHI, R.; DONG, Y.; JIANG, T. M.; LI, Y.M. High salt intake accelerated cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats: time window of left ventricular functional transition and its relation to salt-loading doses. **Clin. Exp. Hypertens.** v.33. p.492-499. 2011.

GIMBRONE, M. A. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 155, p. 1-5, 1999.

GLAGOV, S. et al. Principles of vascular remodeling. In: LANZER, P.; TOPOL, E.J. (Eds.) Panvascular medicine. Berlin – New York: Springer. p. 232-241. 2002.

GORDON, M.K.; HAHN, R.A. Collagens. **Cell. Tissue Res.** v. 339. p. 247-257. 2010

GUPTA, S.P.; PATIL, V.M. Specificity of binding with matrix metalloproteinases. **EXS.** v.103. p.35-56. 2012.

GUPTA, N.; JANI, K.K.; GUPTA, N. Hypertension: salt restriction, sodium homeostasis and other ions. **Indian Journal of Medical Sciences.** v.65 p. 1-12. 2011.

GUYTON, A.C.; COLEMAN, T.G.; BOWER, J.D.; GRANGER, H.J. Circulatory control in hypertension, **Circ. Res.** v. XXVI e XXVII.p. II135-II147. 1970.

HE, F.J.; BURNIER, M.; AND MACGREGOR, G. A. Nutrition in cardiovascular disease: salt in hypertension and heart failure. **European Heart Journal**, v.32. p. 3073–3080.2011.

HE, F.J.; CAMPBELL, N.R.C.; MACGREGOR, G.A. Reducing salt intake to prevent hypertension and cardiovascular disease. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 32, p. 293–300. 2012.

IGNACIO, R.M.; KANG, T.Y.; KIM, C.S.; KIM, S. K.; YANG, Y.C.; SOHN, J.H.; LEE, K.J. Anti-obesity Effect of Alkaline Reduced Water in High Fat-Fed Obese Mice. **Biol. Pharm. Bull.** v. 36. P. 1052-1059.2013.

INTERSALT COOPERATIVE RESEARCH GROUP. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. **BMJ.** v.297. p.319–28. 1988.

IRIGOYEN, M.C. et al. Fisiopatologia da hipertensão arterial. In: NOBRE, F.; SERRANO JUNIOR, C.V.(Eds). **Tratado de cardiologia SOCESP**. São Paulo: editora Manole, 2005, cap.3, 1850p.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.488p.

KRIEGER, J.E.; COWLEY, Jr. A.W. Prevention of salt angiotensin II hypertension by servo control of body water. **Am, J. Physiol.** v. 258.p.H994-H1003. 1990.

LABAT, C.; LACOLLEY, P.; LAJEMI, M.; DE GASPARO, M.; SAFAR, M. E.; BENETOS, A. Effects of valsartan on mechanical properties of the carotid artery in spontaneously hypertensive rats under high-salt diet. **Hypertension**. v. 38. p. 439-443. 2001.

LACCHINI, S.; IRIGOYEN, M.C. Estrutura e Função do Sistema Cardiovascular. In: Margarida de Melo Aires. (Org.). **Fisiologia**. 2ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, v. , p. 325-330.

LACCHINI, S. ; FERLIN, E. ; MORAES, R. ; RIBEIRO, J. P. ; IRIGOYEN, M.C . Contribution of nitric oxide to arterial pressure and heart rate variability in rats submit to high sodium intake. **Hypertension** (Dallas), 2001.

LACCHINI, S.; OLIVEIRA, E. M.; MOREIRA, E. D.; KRIEGER, J. E.; IRIGOYEN, M. C. The interplay of blood pressure, sympathetic discharge, and salt intake in the regulation of renal renin. In: 19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension/12th. European Meeting on Hypertension, 2002, Praga. **Journal of Hypertension**, 2002. v. 20. p. s44.

LACCHINI, S.; FIORINO, P.; IRIGOYEN, M. C. Arterial pressure regulation in normotensive aged rats: effects of NaCl chronic treatment. **Journal of Hypertension**. v. 15, p.40.1997.

LODISH, H. et al. **Molecular cell biology**. 5 ed. New York: W.H. Freeman and Company. 2004, 973p.

LÜSCHER, T.F.; NOLL, G. The endothelium as a regulator of vascular tone and growth. In: **The Endothelium in Cardiovascular Disease**. TF Lüscher Ed. Springer-Verlag, Berlin. p. 1-25. 1995.

McCAWLEY, L.J.; MATRISIAN, L.M. Matriz metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. **Curr.Opin. Cell. Biol.** v. 13. p. 534-540. 2011.

MENETON, P.; JEUNEMAITRE, X.; DE WANDENER, H. E.; et al. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure and cardiovascular diseases. **Physiology Rev.**v. 85, p.679-715. 2005.

MOTT, J.D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Cur.Opin. Cell. Biol.** v. 15. P.558-564.2004

MILLER et al. Biology of Sex Differences. **Biology of sex differences**. v.4 p.6-15. 2013.

PLENZ, G. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. **Atherosclerosis**. v. 166.p.1-11. 2003.

SAFAR, M.E.; THUILLIEZ, C.; RICHARD, V.; BENETOS, A. Pressure-independent contribution of sodium to large artery structure and function in hypertension. **Cardiovasc. Res.** v.46.p.269-276. 2000.

SAKS, F.M. et al. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet. **N. Engl. J. Med.**, v. 344.n. 1, p.3-10. 2001.

SANDBERG, K.; JI, H. Sex differences in primary hypertension. **Biology of Sex Differences**.v.3.p.7-21. 2012.

SANJULIANI, A.F. Fisiopatologia da Hipertensão Arterial: Conceitos úteis para a prática clínica. **Revista da SOCERJ**. v. XV.2002.

SHEN, B.; HAGIWARA, M.; YAO, Y. Y.; CHAO, L.; CHAO, J. Salutory effect of kallistatin in salt-induced renal injury, inflammation, and fibrosis via antioxidative stress.**Hypertension**. v. 51. p.1358-1365.2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA/ SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO / SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq. Bras. Cardiol**.v.95, p.1-51. 2010.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. **J Pathol**. v. 200, p.448-464. 2003.

STHBENS, W.E.Structural and architectural changes during arterial development and the role of hemodynamics. **Acta. Anat**. v.157.p.261-274.1996.

SONG,S.H.; ROACH, M.R. A morphological comparison on aortic elastin from five species as seen with the scanning electron microscope. **Acta Anat**. v. 123.p. 45-50. 1985.

TITZE, J. Water-Free Na + Retention: Interaction with Hypertension and Tissue Hydration. **Blood Purif**. v.26. p. 95-99. 2008

TULIS, D.A.; UNTHANK, J.L.; PREWIT, R.L. Flow-induced arterial remodeling in rat mesenteric vasculature. **Am. J. Physiol**. v. 274, p. 874-882, 1998.

VIEGAS, K.A.S.; LACCHINI, S. Injúria vascular e reestenose: In: Krieger, J.E. (Ed.). **Bases moleculares das doenças cardiovasculares: a integração entre a pesquisa e a prática clínica**. São Paulo. Atheneu, 2008.p.415-432.

WEIR, M.R. Impact of salt intake on blood pressure and proteinuria in diabetes: importance of the renin-angiotensin system. **Miner. Electrolyte Metab.** v. 24 p. 438-445.1998.

WU, T.; QI, X.; LIU, Y.; GUO, J.; ZHU, R.; CHEN, W.; ZHENG, X.; YU, T. Dietary supplementation with purified mulberry (*Morus australis* Poir) anthocyanins suppresses body weight gain in high-fat diet fed C57BL/6 mice. **Food Chem.**.v.141.p.482-487. 2013.

YU, H.C.; BURRELL, L. M.; BLACK, M.J.; WU, L.L.; DILLEY, R. J.; COOPER, M. E.; JOHNSTON, C.L. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats.**Circulation.** v.98.p.2621-2628. 1998.

ZHANG, J. J.; BLEDSOE, G.; KATO, K.; CHAO, L.; CHAO, J. Tissue kallikrein attenuates salt-induced renal fibrosis by inhibition of oxidative stress. **Kidney Int.** v.66. p. 722-732. 2004.

ANEXOS

Tabela 2- Valores individuais para consume de água, excreção de urina e volume retido.

AGUA

	macho			femea		
	cont M	Sal2M	Sal12 M	cont F	Sal2 F	sal12 F
	4	7	8	3	5	5
	3,5	7	8	5	5	4
	3	6,8	6	4	6	7
	4	8	8	2	6	7
	4		7	5	6	6
media	3,7	7,2	7,4	3,8	5,6	5,8
desvio	0,447214	0,541603	0,894427	1,30384	0,547723	1,30384
%	100	194,5946	200	100	147,3684	152,6316

URINA

	macho			femea		
	cont M	Sal2M	Sal12 M	cont F	Sal2 F	sal12 F
	3	5,6	6,5	2,5	3	3,8
	3	6,2	7	4	3	2,3
	2	5	4,3	2,8	4,2	5,2
	3,2	6,8	6,8	1,5	3	4,2
	3		5,8	4,2	5	4
media	2,84	5,9	6,08	3	3,64	3,9
desvio	0,477493	0,774597	1,094075	1,115796	0,920869	1,044031
%	100	207,7465	214,0845	100	121,3333	130

VOLUME RETIDO

	macho			femea		
	cont M	Sal2M	Sal12 M	cont F	Sal2 F	sal12 F
	1	1,4	1,5	0,5	2	1,2
	0,5	0,8	1	1	2	1,7
	1	1,8	1,7	1,2	1,8	1,8
	0,8	1,2	1,2	0,5	3	2,8
	1		1,2	0,8	1	2
media	0,86	1,3	1,32	0,8	1,96	1,9
desvio	0,219089	0,416333	0,277489	0,308221	0,712741	0,583095
%	100	151,1628	153,4884	100	245	237,5

Tabela 3- Médias semanais de peso corporal e desvio padrão da média semanal

Média semanal

Semana de Tratamento	Cont-M	Sal2-M	Sal12-M	Cont-F	Sal2-F	Sal12-F
1	18,6±0,7	19,649	21,84667	16,356	18,531	17,205
2	20,5±0,8	20,445	17,16167	17,284	18,12	17,22833
3	22,2±1,0	21,891	18,47	20,126	19,582	19,13667
4	21,2±1,7	21,749	20,97167	19,5	18,826	19,77333
5	19,5±2,2	21,295	20,865	19,778	18,342	19,72
6	22,3±1,8	22,935	21,05667	20,478	17,812	20,20833
7	29,5±5,7	23,132	22,458	21,118	18,726	22,22667
8	21,4±0,8	23,971	25,01	22,564	19,80	21,33333
9	20,8±1,2	24,814	25,648	21,982	19,81	22,92833
10	22,7±1,9	25,532	26,838	20,418	20,56	22,035
11	24,5±0,8	25,318	26,362	21,832	21,348	21,035
12	24,2±1,9	27,578	29,748	22,602	20,852	21,16833

Desvio Padrão da Média semanal

Semana de Tratamento	Cont-M	Sal2-M	Sal12-M	Cont-F	Sal2-F	Sal12-F
1	0,724831	1,077831	0,81904	2,256043	0,896727	1,449231
2	0,834008	1,14528	0,769608	1,145875	0,769608	1,627899
3	1,014036	0,896727	0,896727	5,312074	1,077831	1,319086
4	1,702962	1,705247	1,709742	0,923093	0,81904	1,14528
5	2,224972	0,769608	0,793316	0,535369	0,896727	1,077831
6	1,851702	0,81904	1,78435	1,541888	1,705247	1,403202
7	5,722305	1,705247	1,71698	1,345704	1,705247	1,705247
8	0,798386	2,232514	0,682019	0,814389	2,012454	2,891094
9	1,185445	1,705247	2,012454	1,543136	1,14528	1,867356
10	1,86733	2,995391	1,661782	1,491717	1,689083	2,152986
11	0,755824	2,232514	2,16189	1,371156	0,82342	1,171747
12	1,948161	2,381747	2,062128	2,452177	0,634563	1,387738